

# Nivel de Contaminación por Ocratoxina A en Sangre Materna y de Cordón Umbilical en Cochabamba Bolivia

E. R. Flores, E. V. Ferrufino

Centro de Biotecnología  
Universidad Mayor de San Simón  
Cochabamba, Bolivia  
e-mail: biotec@fcyt.umss.edu.bo

## Resumen

La Ocratoxina A (OTA) es un metabolito producido por algunas especies de hongos entre ellas *Aspergillus ochraceus* y algunas del género *Penicillium*. Se conocen diferentes efectos producidos por esta micotoxina como la Nefrotoxicidad, Citotoxicidad, Carcinogenesis, Teratogenesis e Inmunotoxicidad. La Ocratoxina A ha recibido una considerable atención desde 1993 cuando la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 1993) clasificó esta toxina como un posible carcinógeno humano (grupo 2B) basado en evidencia suficiente por estudios de carcinogenicidad en animales de experimentación e inadecuada evidencia en humanos.

Debido a la importancia de la posible transmisión de la Ocratoxina A desde la madre hacia el niño, en el presente estudio, se ha determinado los niveles de Ocratoxina A encontrándose que de un total de 31 muestras de plasma materno y cordón umbilical 4 resultaron positivas en ambos tipos de muestra, (incidencia 13 %, error admisible de 12 % respecto a la población con 95 % de confianza). Las muestras de plasma materno se encontraron en un rango de 0,3 a 10,2 ng/ml con una media de 3,0 ng/ml ( $\pm$  SD = 3,0). De igual manera, en el plasma de cordón umbilical se detectó también Ocratoxina A en cuatro muestras, con valores de 0,3 a 1,7 ng/ml y con una media de 0,7 ng/ml ( $\pm$  SD=0.65). Confirmándose así el traspaso de la micotoxina a través de la barrera placentaria.

## 1. Introducción

La Ocratoxina A (OTA) es una micotoxina nefrotóxica y nefrocarcinógena producida generalmente por los hongos *Penicillium verrucosum* y *Aspergillus ochraceus*. Las condiciones de post cosecha son los factores preponderantes para la producción de Ocratoxina A y consecuentemente la contaminación de alimentos y forrajes. Se ha reportado

en casi todos los cereales incluyendo maíz, cebada, trigo, sorgo, centeno, avena y arroz [10, 23].

La Ocratoxina A ha recibido una considerable atención desde 1993 por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer [20] quienes clasificaron esta toxina como un posible carcinógeno humano del grupo 2B (evidencia suficiente por estudios de carcinogenicidad en animales de experimentación e inadecuada evidencia en humanos). Debido a su frecuencia en un amplio rango de alimentos, la presencia de Ocratoxina A en sangre humana ha sido sugerida como un indicador directo de la exposición. Análisis de muestras de suero humano en varios países de Europa revelaron que la sangre de personas sanas frecuentemente contenían Ocratoxina A, lo cual podría confirmar una continua y amplia exposición [4].

La Ocratoxina A es una molécula de bajo peso molecular (403.83 daltons), que incluye un 7-carboxi-5-cloro-8-hidroxi-3,4-dihidro-(3R)-metil isocumarina enlazado a través del grupo carboxilo a una L- $\beta$ -fenilalanina. Es de color blanco, inodora, cristalina, el punto de fusión de la toxina cristalina pura esta en el rango de 168-173°C; es ópticamente activa:  $[\alpha]_D^{25}$ : -46.8° (C=2650  $\mu$ mol/litro en cloroformo), la absorción en el espectro ultravioleta varia según el tipo de solvente; así en etanol la absorción máxima es alcanzada a 213 nm ( $\epsilon$  36,800) y 332 nm ( $\epsilon$  6,400). Entre los diferentes mecanismos de toxicidad se encuentra su acción sobre la síntesis de proteínas. La inhibición de la síntesis de proteínas es específica, con el efecto directo de la Ocratoxina A en la traducción de la síntesis de proteínas. Esto se debe a una inhibición competitiva de la enzima Fenilalanina-tRNA sintetasa (PheRS) que cataliza la reacción de aminoacilación y así la elongación del péptido es detenida [6, 22].

La lipoperoxidación se considera como un mecanismo de reacción dañino para los sistemas biológicos (Baber y Bernheim, 1967 citado por [8]), se constituye en un importante mecanismo oxidativo de las lesiones tisulares, y en última instancia determina citotoxicidad.

La Ocratoxina A es un potente teratógeno en ratones, ratas, hámsters y pollos [16], pero no en cerdos [30]. Las diferencias de susceptibilidad entre las especies se atribuye al tipo de transferencia placentaria de Ocratoxina A [16], en la ruta de administración y el tiempo de aplicación de la toxina durante el periodo de gestación.

Principalmente el sistema nervioso central, el ojo y el esqueleto axial son afectados. La administración oral de una dosis simple de Ocratoxina A tan baja como 1.0 mg/kg de peso corporal durante la gestación produce malformaciones en los fetos de los ratones y de las ratas. Un incremento de la mortalidad prenatal fue reportado [25, 26, 31]. A nuestro conocimiento no hay estudios realizados sobre la teratogenicidad en humanos.

En este trabajo se pretendió evaluar la implicación de la Ocratoxina A en la transferencia placentaria y la producción de lipoperoxidación a nivel de sangre materna y sangre de cordón umbilical, determinando el nivel de contaminación existente y la posible implicación en la transmisión de esta micotoxina de la madre al niño en muestras de pacientes que ingresaron al Hospital N° 2 de la Caja Nacional de Salud.

## 2. Material y Métodos

### 2.1. Materiales

#### 2.1.1. Muestras:

Las muestras de sangre de cordón umbilical y sangre materna fueron obtenidas de voluntarias que asistieron al Departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital Obrero N° 2 de la Ciudad de Cochabamba. De cada voluntaria se tomaron durante el parto, sangre del torrente sanguíneo y sangre del cordón umbilical.

#### 2.1.2. Reactivos Químicos:

*Solventes Orgánicos:* Cloroformo p.a. y ácido acético glacial fueron obtenidos de J.T. Baxter (México); acetonitrilo grado HPLC de Sigma-Aldrich (USA); metanol grado HPLC de Scharlau Chemie S.A ( España).

*Otros químicos:* Ácido fosfórico p.a. y bicarbonato de sodio p.a. de J.T. Baxter (México); cloruro de sodio p.a. de Riedel-deHaen (Alemania); Fosfato buffer salino PBS (NaCl 120 mM, KCl 2.7 mM y Fosfato buffer 10mM pH 7.4 a 2°C), Trizma base, EDTA de Sigma-Aldrich (USA); ácido clorhídrico 12N de Scharlau Chemie S.A. (España).

Agua grado HPLC obtenida por un sistema Milli-Q fue proporcionada por Laboratorios de Droguería INTI (La Paz).

Ocratoxina A en su forma cristalizada fue obtenida de Sigma-Aldrich (USA).

#### 2.1.3. Aparatos y Equipos

El sistema cromatográfico consistió de una bomba Series 200 (Perkin-Elmer, USA) con una válvula de inyección de 20 $\mu$ l, un detector de fluorescencia LC240 (Perkin-Elmer USA)(longitud de excitación 333 nm y de emisión de 470). Para la medición del área o altura de los picos se utilizó el integrador modelo Chromatopac CR 601 Shimadzu (Japón). Las separaciones se llevaron a cabo con la ayuda de una columna de fase reversa Spherisorb OD2 C18 (5  $\mu$ m de tamaño de partículas, 250 x 46mm I.D.) y una precolumna C18. La limpieza de los extractos se llevó a cabo con las inmunocolumnas (Ochratest) provenientes de VICAM (USA) y con el dispositivo de elusión (Vac-Elut) provisto por VARIAN (USA) conectado a una bomba de vacío. La extracción de las muestras se llevo a cabo gracias al aparato de dispersión ULTRA-TURRAX T25 Basic, proporcionado por IKA Labortechnik (Alemania). Centrífuga IEC Centra-MPA (USA) refrigerada para la separación de las muestras, centrífuga Kontron Hermle Z 365 (Alemania) para la extracción de las muestras.



## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Condiciones Cromatográficas

Fase móvil (filtrada y desgasificada), consistió en acetonitrilo-agua-ácido-acético (450+540+10,v+v+v), rango de flujo en 1 ml/min, volumen de inyección de 20  $\mu$ l, temperatura ambiente. El tiempo de retención se fijó en  $11.8 \pm 0.66$  min. (Límites de confianza 98 %), para la cuantificación se utilizó la altura de los picos, comparando con la curva de calibración entre los rangos de 0.5–2 ng. de OTA/ml. El cálculo de las curvas de calibración se realizó por el método regresión lineal de los mínimos cuadrados. Después de cada jornada de trabajo, se procedió a la limpieza de la columna con la solución acetonitrilo – agua (75+25,v+v).

### 2.2.2. Preparación de Soluciones Estandar

Una solución stock de Ocratoxina A de 40 mg/ml fue preparada en Tolueno-ácido acético (99+1;v+v) y se guardó en oscuridad a  $-20^{\circ}$ . Se prepararon alícuotas de 2.5  $\mu$ g de Ocratoxina A que se evaporaron y guardaron secas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las soluciones de calibración se prepararon disolviendo los 2.5  $\mu$ g de Ocratoxina A en 25 ml de fase móvil y se realizaron diluciones sucesivas en el mismo solvente. Las soluciones estándar se prepararon cada vez que se procedió a realizar la inyección de las muestras.

### 2.2.3. Protocolo de Extracción Utilizado en la Estandarización del Análisis de Plasma Humano

Un ml de plasma se mezcló exhaustivamente durante 2 minutos con 10 ml de una solución ácida (0.15 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 2 M NaCl, llevando a pH 1.6 con NaOH). Se añadieron 10 ml de cloroformo y se mezcló con Ultra-Turrax T25 a 11.000 rpm durante 2 minutos, y la mezcla resultante fue centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos. La extracción con cloroformo se repitió dos veces más. Todas las fracciones de cloroformo fueron juntadas. La Ocratoxina A fue extraída dos veces de la fracción de cloroformo adicionando para cada extracción 5 ml de  $\text{NaHCO}_3$  0.5 M a  $4^{\circ}\text{C}$  agitando suavemente, las fracciones de bicarbonato fueron colectadas y unidas, para luego pasar a la columna de inmunoafinidad.

### 2.2.4. Protocolo de Limpieza por Inmunoafinidad

Se equilibró la columna de inmunoafinidad con PBS a  $4^{\circ}\text{C}$ , posteriormente se añadió el extracto de bicarbonato de sodio que contiene la Ocratoxina A de la muestra. Una vez lavada la columna con agua Milli-Q y secada con aire, la Ocratoxina A fue eluida con metanol, y este se evaporó bajo atmósfera de nitrógeno con ayuda de un baño de agua a  $45^{\circ}\text{C}$ , el residuo se redisolvió en 500  $\mu$ l de fase móvil y se inyectó al HPLC.



### 3. Resultados

#### 3.1. Reproducibilidad de las Soluciones Estandar de Ocratoxina A

Se prepararon cuatro puntos de calibración cubriendo el rango esperado del contenido de Ocratoxina A en las muestras, las cuales se inyectaron por duplicado en cada jornada de inyección de las muestras, por lo cual se obtuvieron resultados de la reproducibilidad en el día y entre días (ver cuadro 1 y 2).

n	Concentración (ppb)	Cantidad (pg)	Altura (Unidades arbitrarias)		Promedio altura n=2	±SD	%CV
1	0.5	10	177	176	177	0.7	0.4
2	1	20	322	309	316	9.2	2.9
3	1.5	30	505	527	516	15.5	3.0
4	2	40	876	814	845	43.8	5.2

**Cuadro 1:** Reproducibilidad de las soluciones estandar de Ocratoxina A inyectadas el mismo día.

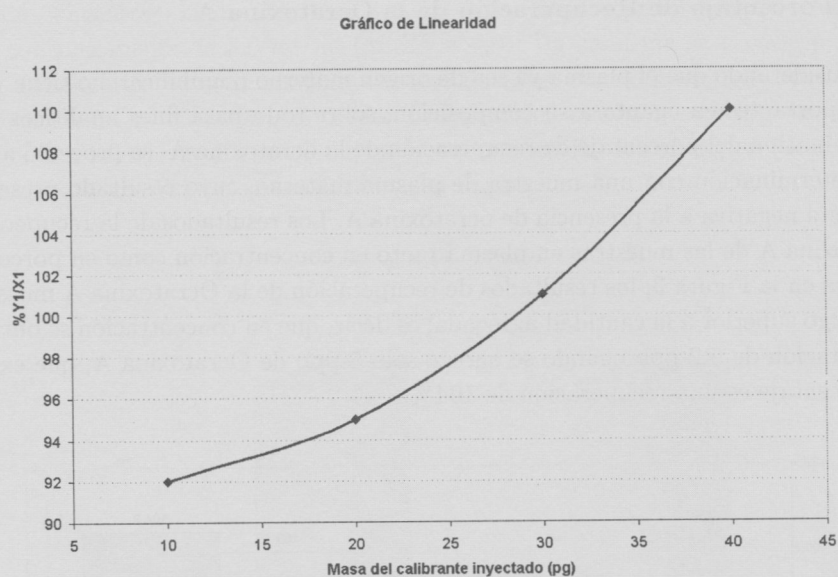
n	Concentración (ppb)	Cantidad (pg)	Altura (Unidades arbitrarias) n=2		Promedio altura n=4	±SD	%CV
1	0.5	10	177	160	168	12	7.1
2	1	20	316	378	347	43.8	12.6
3	1.5	30	516	592	554	53.7	9.7
4	2	40	845	756	800	62.9	7.8

**Cuadro 2:** Reproducibilidad de las soluciones estandar de Ocratoxina A inyectadas en días diferentes.

Hald *et al.*[19] establecieron los valores aceptables del coeficiente de variación para la reproducibilidad de las soluciones estándares inyectadas el mismo día cuyo valor es de  $CV \leq 3\%$ . En nuestro estudio, el punto correspondiente a una concentración de 2 ppb para el estudio de reproducibilidad en el mismo día, se encuentra fuera de este valor límite. Sin embargo, los tres primeros valores entran dentro del rango límite establecido. Además que los resultados del nivel de Ocratoxina A en las muestras positivas, se encuentran entre estos valores de la curva de calibración. Los mismos autores establecieron también los valores aceptables de la reproducibilidad de las soluciones estándares en diferentes días ( $CV \leq 5\%$ ). En el presente estudio se ha intentado repetidas veces disminuir nuestros valores del coeficiente de variación para la reproducibilidad sin tener mucho éxito; esto puede deberse a factores externos propios de nuestro medio como la fluctuación eléctrica de un día a otro, las variaciones de temperatura y otros.

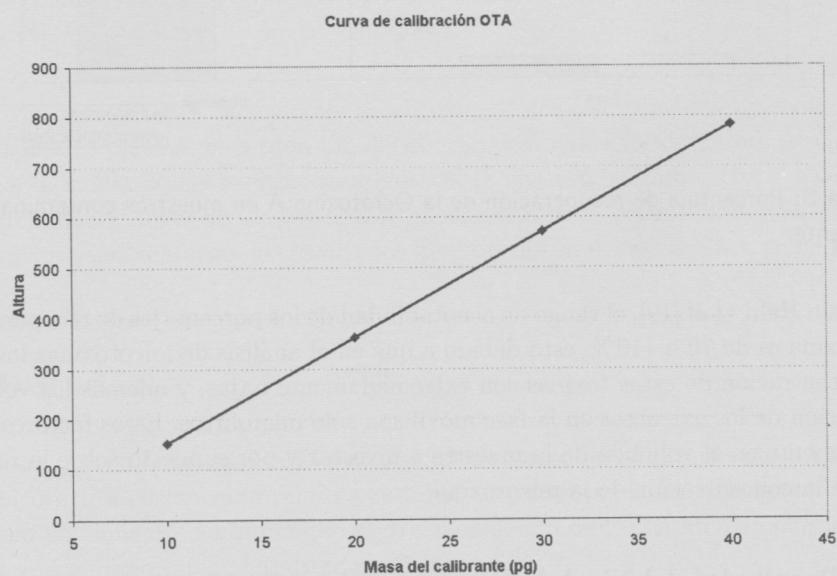
En cromatografía el límite de detección está definido como la relación señal / ruido = 3/1. En el presente estudio con los equipos usados y la toxina empleada se ha determinado el valor del límite de detección igual a 0.3 ng/ml. Por razones prácticas se ha construido la curva de calibración a partir de 0.5 ng/ml.

El Diagrama de linealidad es una construcción gráfica de la curva de calibración para observar su comportamiento lineal como se observa en la Figura 1. La linealidad es aceptada si los valores se encuentran entre los valores de  $100 \pm 15\%$ . En la Figura



**Figura 1:** Gráfico de Linearidad. %Y1/X1: Relación individual de cada punto de calibración o la relación respuesta/masa individual.

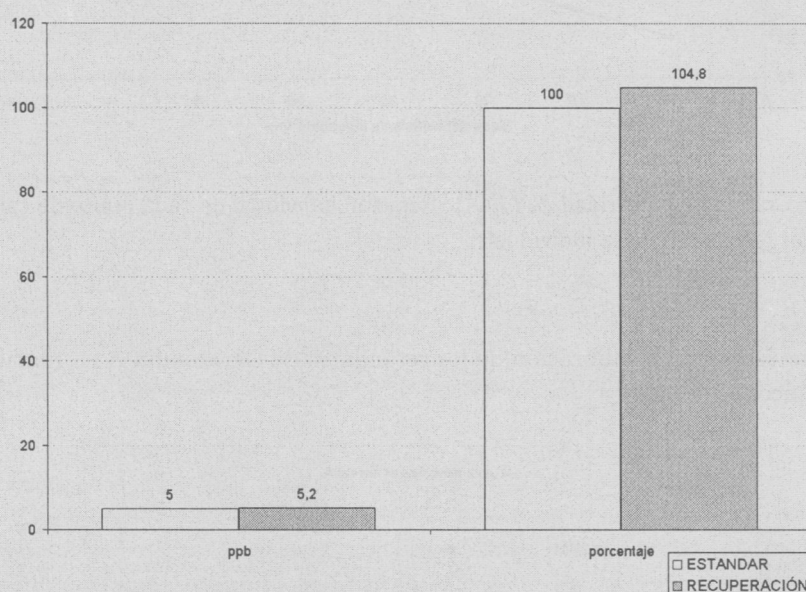
2 se obtiene la curva de calibración de los estándares de Ocratoxina A en función de la altura de pico.



**Figura 2:** Curva de Calibración de la Ocratoxina A.

### 3.2. Porcentaje de Recuperación de la Ocratoxina A

Considerando que el plasma ya sea de origen materno o umbilical, no tiene variaciones importantes en cuanto a su composición, sobre todo para fines analíticos como la determinación del porcentaje de recuperación de la ocratoxina A, se procedió a realizar esta determinación con una muestra de plasma materno, cuyo resultado presenta una respuesta negativa a la presencia de ocratoxina A. Los resultados de la recuperación de Ocratoxina A de las muestras en plasma tanto en concentración como en porcentaje se muestra en la Figura 3; los resultados de recuperación de la Ocratoxina A muestran un valor algo superior a la cantidad agregada; es decir, que en concentración se obtuvo una recuperación de 5,2 ppb cuando se agregó solo 5 ppb de Ocratoxina A, que expresado en porcentaje es una recuperación de 104 %.



**Figura 3:** Porcentaje de recuperación de la Ocratoxina A en muestras contaminadas artificialmente.

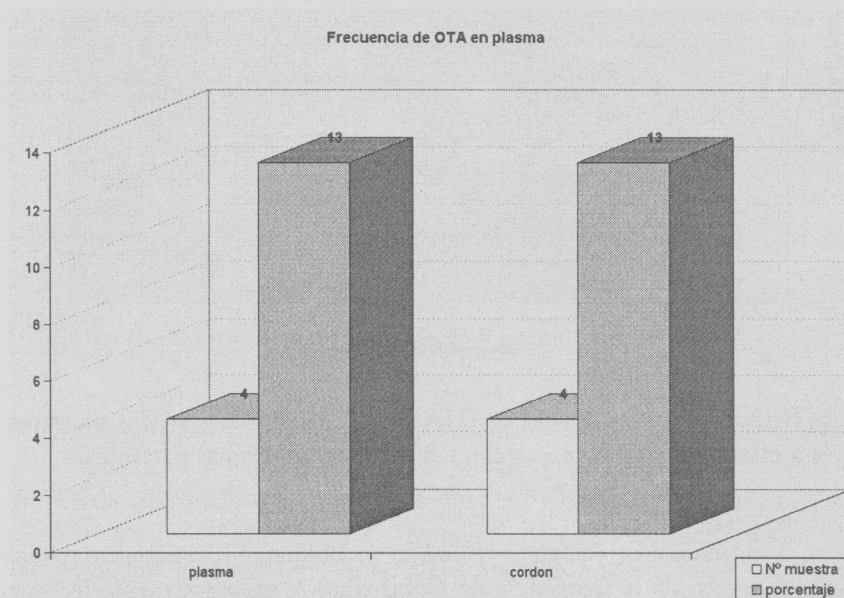
Según Hald *et al.*[19], el rango de aceptabilidad de los porcentajes de recuperación de micotoxina es de 70 a 110 %, esto debido a que en el análisis de micotoxinas los niveles de concentración de estas toxinas son extremadamente bajas, y además los volúmenes de dilución de los extractos en la fase móvil son solo microlitros. Estos factores inciden directamente en el volumen de la muestra a inyectar y por supuesto sobre la respuesta final de la concentración de la micotoxina.

### 3.3. Resultados del Nivel de Ocratoxina A en las Muestras

De un total de 31 muestras de plasma materno cuatro resultaron positivas a la Ocratoxina A. Esto corresponde a un porcentaje en el plasma materno de 13 %. El



rango de concentración de Ocratoxina A en las muestras positivas es de 0,3 a 10,2 ng/ml con una media de 3,0 ng/ml ( $\pm$  SD = 3,0). De igual manera, en el plasma de cordón umbilical se detectó también Ocratoxina A en cuatro muestras; pero el rango de concentración en el plasma de cordón umbilical fue mucho menor que en el plasma materno, con valores de 0,3 a 1,7 ng/ml y con una media de 0,7 ng/ml ( $\pm$  SD=0.65). Gráficamente estos valores se muestran en la Figura 4.



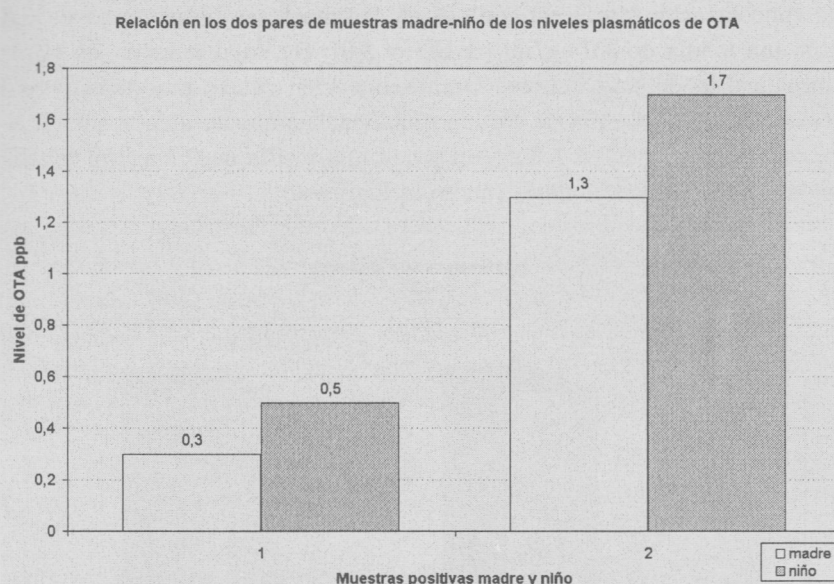
**Figura 4:** Número de muestras positivas y su correspondiente porcentaje en plasma materno y cordón umbilical.

Entre los resultados encontrados se obtuvieron dos muestras cuyo plasma materno y el respectivo plasma de cordón umbilical eran positivos en Ocratoxina A. Contrariamente a la media de los resultados obtenidos, se observó en ambos casos y de manera específica, que el nivel de Ocratoxina A encontrado en el cordón umbilical era mayor que el del plasma materno, los resultados de estas dos muestras se ilustran en la Figura 5.

#### 4. Discusión

La exposición humana a la Ocratoxina A se monitorea determinando los niveles de esta micotoxina en la sangre, de manera que su presencia es un indicador directo del consumo de alimento contaminado. Esto dependiendo de los hábitos alimenticios de la madre y el periodo estacional de su medio.

En el presente estudio se han analizado un total de 31 muestras de sangre materna y sus respectivas 31 muestras de sangre de cordón umbilical en la región de Cochabamba-Bolivia. Este, se constituye en el segundo reporte acerca del nivel de contaminación por



**Figura 5:** Relación entre los niveles de OTA en ppb encontrados en dos muestras correspondientes a plasma materno y de cordón umbilical de las mismas pacientes.

Ocratoxina A en muestras biológicas realizado en Bolivia; el primero fue realizado por Ferrufino [14] acerca de la frecuencia de Ocratoxina A en muestras de leche materna en Cochabamba Bolivia; donde en algunos casos los niños lactantes eran expuestos a concentraciones que excedían a los niveles permisibles establecidos por la JECFA-Joint Expert Committee on Food Additives (Tolerable daily intakes = 14.3 ng ocratoxina A/kg peso corporal/día).

Como se observa en el cuadro 3, a lo largo de los años se han obtenido datos de la exposición humana a esta toxina por medio de una serie de análisis sanguíneos, estos análisis se desarrollaron en diferentes países Europeos, se observaron diferencias de acuerdo a la procedencia de las muestras.

Comparando los resultados encontrados en el presente estudio con los observados en el cuadro 3, tenemos que el rango de concentraciones encontrado está entre 0.3–10.2 ng/ml para sangre materna y 0.3–1.7 ng/ml para sangre de cordón umbilical, los cuales son en el primer caso similares a los rangos encontrados en Alemania y Dinamarca. Sin embargo, la frecuencia encontrada de 13 % es mas baja que en estos países, lo cual puede deberse a los límites de detección empleados en cada estudio y la época estacional de la toma de muestras. Este resultado tiene un 12 % de error admisible con respecto a la población lo cual se determinó con un 95 % de confianza y que puede deberse al número de muestras tomadas; a través de los resultados encontrados en sangre de cordón se confirma el traspaso de la Ocratoxina A a través de la barrera placentaria.

En las muestras de sangre de cordón umbilical dos muestras resultaron ser positivas junto a los correspondientes plasmas de las madres, mostrando estas últimas valores

País	Año	N° Muestras analizadas	Incidencia	Rango ng/ml	Valor promedio ng/ml	Referencia Bibliográfica
Alemania	1977	165	50.9 %	0.1-14.4	0.79	[2]
	Munich	141	63.1 %		0.42	[2]
	Hessia	208	68.3 %	0.1-8.4	1.0 <sup>m</sup> -1.3 <sup>h</sup>	[17]
Dinamarca	1986				1.5	[18]
	1987	144	54.2 %	0.1-13.2	2.3	
	1988					
Francia						[11]
	Región Alsacia		19.6 %	0.1-2		
	Rhône-Alpes		14.6 %	0.1-2		
Polonia			18.7 %			
	Aquitania					
Polonia	1985	216	4.2 %			[7]
		1065	7.2 %			
Suecia	1991	297	12.8 %	0.3-0.67		[3]
	1993**	39	100 %	0.09-0.94	0.167	[5]
Suiza	1995***	368	100 %			[32]
Canadá	1990	219			0.16-3.7	[24]
	1991				0.9-9	
Noráfrica						
Túnez	1993	442	70 % <sub>s</sub>			[1]
		310	100 % <sub>e</sub>			
Argelia	1993	346	67 % <sub>s</sub>			[21]
	1993	84	95 % <sub>e</sub>			

\* Comparación de dos grupos de estudio pacientes con desórdenes renales y personas sana.

Todas las muestras contenían Ocratoxina A.

\*\* Madres que daban lactancia.

\*\*\* Bajo límite de cuantificación: 5-10pg/ml s sanos. e enfermos. h hombres. m mujeres

### Cuadro 3: Incidencia de Ocratoxina A en Algunos Países.

más elevados (ver Figura 5). Estos hallazgos podrían deberse a diferentes razones, la exposición a la toxina puede ser por periodos continuos y a bajas concentraciones, lo cual determinaría un nivel constante pero bajo en el torrente sanguíneo, dicho de otra manera, la concentración de Ocratoxina A depende de la duración de la exposición y de la cantidad de la toxina ingerida. De manera no esperada se encontró la toxina en muestras de sangre de cordón umbilical en madres que no tenían un nivel detectable de Ocratoxina A en el torrente sanguíneo, este resultado podría deberse a varias causas: la madre pudo estar en contacto con un alimento contaminado durante el periodo de gestación, y que seguramente adquirió un nivel detectable en su plasma durante este periodo, el cual fue transmitido al gestante directamente. Si bien, la madre tiene una alta capacidad para eliminar la toxina, el feto no tiene aún desarrollado su sistema de descontaminación de ciertos metabolitos o toxinas, lo cual hace suponer que los mismos permanecen en el organismo del gestante por períodos más largos y que los mismos los elimina progresivamente vía el cordón umbilical para que la madre los elimine definitivamente. Este resultado es similar a un trabajo realizado por Maxwell *et al.* [27] donde se determinaron aflatoxinas en la madre y el cordón umbilical, obteniendo también resultados positivos en sangre de cordón umbilical en madres que no tenían un nivel de Aflatoxina en plasma, estos autores concluyeron que el nivel encontrado se debía a una acumulación de Aflatoxina en el feto. En otra experiencia en conejos realizada por Ferrufino *et al.* [15], se encontró una diferencia aumentada en la capacidad de acumular la toxina en el cuerpo de las crías respecto a los adultos, lo cual podría realizarse de manera similar en otros mamíferos y el hombre.

La Comisión Europea [9] sugirió que el principal alimento contribuyente a la ingesta de Ocratoxina A son los cereales y subproductos y se ha determinado que la Ocratoxina A es uno de los principales contaminantes del maíz [29]. El maíz es uno de los alimentos de mayor consumo de la población Cochabambina; la cosecha de este grano se realiza especialmente entre Abril y Mayo; y se almacena por mas de un año, donde el producto



puede sufrir serios daños por las malas condiciones de almacenaje, elevadas temperaturas y humedad en la estación de verano (Noviembre y Enero). Durante éste último periodo se crean las condiciones óptimas para el desarrollo del hongo, lo cual sería un factor que aumenta la frecuencia de Ocratoxina A en los meses de Febrero y Marzo. Ferrufino [13] demostró una variación estacional de los niveles de Ocratoxina en muestras de leche materna. De otra parte, en Abril se tiene una nueva cosecha la cual tendría un nivel más bajo de toxina, por lo que los niveles en sangre humana podrían descender significativamente, este último podría ser una razón para la baja incidencia encontrada en los análisis de las muestras del presente estudio cuyo muestreo se realizó entre los meses de Marzo y Abril.

Por otro lado la procedencia de las muestras es de gran importancia, por que va de acuerdo a los hábitos alimenticios, la mayoría de las muestras fueron tomadas al azar y procedían de distintas zonas de la ciudad de Cochabamba, de manera especial la mayoría de las muestras positivas provenían de áreas peri-urbanas, las cuales poseen hábitos alimenticios similares al común de la población compuesta principalmente de cereales, carne vacuna y pollos.

En los países desarrollados se conoce la necesidad de poseer regulaciones sobre los límites en el nivel de micotoxinas en alimentos y piensos, la mayoría de ellos poseen regulaciones específicas; mientras que, otros países en desarrollo como Bolivia no tienen regulaciones. Los límites fijados dependen de varios factores como la disponibilidad de datos toxicológicos, frecuencia de Ocratoxina A en los alimentos y métodos de muestreo y análisis [12]. Durante los últimos años se han propuesto diferentes niveles tolerables. La evaluación toxicológica de la Ocratoxina A se llevó a cabo entre 1991 y 1995 por la JECFA [12], estableciendo una provisional entrada tolerable semanal de 100 ng/kg de peso corporal, correspondiendo a un TDI (Ingesta diaria tolerable) de 14.3 ng/kg peso corporal / día, esto sin tomar en cuenta la producción de carcinogenicidad y solamente el daño renal producido. Kuiper-Goodman y Scott [25] calcularon el TDI de la Ocratoxina A tomando en cuenta la carcinogenicidad, el TDI resultó de 4.2ng/kg de peso corporal /día en humanos. Si asumimos que el porcentaje de plasma en la sangre para un recién nacido es de 44 %, esto representaría un volumen de 27.4 ml de plasma para 1 Kg de peso corporal, esto correspondería en base a la medida de los resultados encontrados en este estudio, a un nivel de Ocratoxina A de 19.18 ng/kg de peso corporal. En cambio una mujer adulta que tiene un porcentaje de plasma de 55 % y un volumen de 36.6 ml de plasma por 1 kg de peso, el nivel de Ocratoxina A en el organismo sería de 109.8 ng/kg de peso corporal. Ambos resultados se encuentran muy por encima del valor del TDI, considerando el efecto carcinogénico al igual que el valor establecido por la FAO. Analizando estos resultados, el valor encontrado en plasma de cordón umbilical se encuentra próximo al nivel de TDI de 14.2 ng OTA/kg de peso corporal, sin embargo, este valor se considera en términos generales para los adultos, en consecuencia, no se descarta que los efectos de la Ocratoxina A en el feto sean mucho mayores a las de un adulto.

En otros estudios se determinó que la ingesta media de Ocratoxina A de 0.7 ng OTA/kg de peso corporal corresponde a una concentración en el suero sanguíneo de 0.25 ng/ml de Ocratoxina A [32]. Adicionalmente, en estudios basados en el análisis de

suero sanguíneo, la exposición prenatal de Ocratoxina A es de alrededor del doble al de la madre (0.5 ng/ml), al menos inmediatamente antes del nacimiento [32]. Tomando en cuenta los resultados determinados en el presente estudio, la mayoría de las muestras positivas se encontrarían por encima de estos valores, que añadiendo el efecto de la posible acumulación en tejidos y la variación estacional, nos situaría ante un resultado que podría tener consecuencias toxicológicas en un futuro.

## 5. Conclusiones

La ocratoxina A es una sustancia tóxica que tiene propiedades nefrotóxicas, inmunosupresivas, teratogénicas y cancerígenas. El presente trabajo es una ayuda para aumentar el conocimiento sobre el nivel de contaminación con ocratoxina A en plasma del cordón umbilical como un parámetro directo del grado de contaminación del ser humano durante el periodo de gestación.

Existen varias técnicas analíticas para la determinación de ocratoxina A en diferentes matrices, una de las técnicas más usadas recientemente es la purificación por inmunoafinidad y su separación por cromatografía líquida de alta performance HPLC acoplado a un detector de fluorescencia. Esta técnica permitió no solo recuperar porcentajes elevados del analito (cerca del 100 %) sino también permite detectar trazas del mismo que pueden alcanzar al orden de las partes por trillon-ppt; en el presente estudio se ha logrado alcanzar una detectabilidad en ocratoxina A en las muestras de plasma sanguíneo de 0.3 ppb.

De un total de 31 muestras analizadas de plasma sanguíneo y otras 31 de plasma de cordón umbilical, se han detectado en cada grupo 4 muestras positivas en ocratoxina A, demostrando de esta manera que existe una verdadera transferencia placentaria de la toxina. Esto corresponde en cada caso a una frecuencia de contaminación del 13 %. En el primer grupo el rango de contaminación de las muestras positivas fué de 0.3–10.2 ng/ml y en el segundo grupo fué de 0.3–1.7 ng/ml.

La presencia de ocratoxina A en muestras de plasma de cordón umbilical y no así en su correspondiente plasma materno, hacen suponer que la toxina permanece por periodos mas largos en la bolsa placentaria que en la misma sangre de la madre, ocasionando una posible acumulación de la toxina en el feto. Es importante realizar estudios más profundos en este campo. La mayoría de las muestras positivas, provenían de madres que habitan áreas periurbanas de la ciudad de Cochabamba, lo cual es importante por los hábitos alimenticios de cada sector, lo ideal sería llevar a cabo un estudio con un mayor número de muestras representativas de cada sector de la población para tener una mejor visión de la frecuencia de contaminación con Ocratoxina A.

Para la Unión Europea [9] se estimó la exposición a la ocratoxina A por dos métodos diferentes. El primero relaciona la ocurrencia de la toxina en el alimento con los datos del consumo de los diferentes alimentos susceptibles de contaminación. En base a estos datos, dicha Comisión estimó un consumo alimentario de ocratoxina A para el promedio de las personas adultas que viven en la Unión Europea de 0.7 a 4.6 ng/kg peso corporal/día. Valores algo más bajos fueron estimados basados en los datos del

nivel de contaminación en el plasma sanguíneo (0.2 a 2.4 ng/kg peso corporal/día). Es importante remarcar, que en los países subdesarrollados como Bolivia, no se cuentan con datos sobre el nivel de contaminación de los alimentos con micotoxinas, el consumo *per capita* medio de los alimentos y menos aún del grado de contaminación en los diferentes fluidos biológicos.

De manera general, se observó que el principal contribuidor al consumo de ocratoxina A en los humanos, son los cereales y sus derivados (pan, café, cerveza, etc) ya que estos productos presentan niveles importantes de contaminación y además son productos altamente consumidos por la población mundial en general. Por ejemplo, para un alto consumidor de cereales como son en los países subdesarrollados, un consumo diario de 200 g de cereal con un contenido de ocratoxina A de 1 µg/kg contribuye en 200 ng de la toxina en la dosis alimentaria diaria.

Esta ampliamente demostrada la presencia natural de ocratoxina A en los alimentos por el gran número de muestras de sangre humana en las que se detectó ocratoxina A. Las concentraciones de ocratoxina A encontradas en las muestras de sangre fueron de 0.18–1.8 ng/ml [9]. Esta amplia presencia de ocratoxina A en la sangre humana puede estar relacionada a la larga media vida de la toxina en los humanos (35.5 días)[28].

En la mayoría de los países, los gestantes y bebés probablemente tienen un mayor consumo por kg de peso corporal que los adultos. Sin embargo, no se han realizado consideraciones especiales sobre las dosis diarias admisibles para grupos críticos como los bebés, niños y los mismos gestantes. Esta demostrado que los recién nacidos, especialmente los prematuros no tienen desarrollado totalmente su sistema renal y su metabolismo hepático. Por lo que es importante aumentar los factores de seguridad para estos grupos vulnerables, protegiendo especialmente a las madres durante el embarazo.

La exposición a contaminantes químicos durante los primeros años de vida del ser humano ha sido parte esencial de los debates en seguridad alimentaria para mejorar la salud humana. Los datos presentados en el presente trabajo pueden ser tomados en cuenta para estudios de evaluaciones de dosis alimentarias y la determinación de límites aceptables en diferentes alimentos para madres embarazadas.

### 5.1. Agradecimientos

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo económico de la Cooperación de la Región Francófona de Bélgica-CIUF. Un agradecimiento especial a todo el personal del Programa de Alimentos de la Facultad de Ciencias y Tecnología de la UMSS, por su apoyo y colaboración.

### Referencias

- [1] H. Bacha, K. Maaroufi, A. Achour, M. Hammami, F. Ellouz, y E.E. Creppy. Ochrotoxines et ochratoxicoses humaines en Tunisie. En *Human Ochrotoxicosis and its Pathologies*, Vol. 231. Eurotext (Montrouge, France: John Libbey), pp 111–121(in



- French). Edited by: E.E. Creppy, M. Castegnaro and G. Dirheimer Ed. Colloque INSERM, 1993.
- [2] J. Bauer y M. Gareis. Ochratoxin A in the food chain. *J. Vet. Med.*, B. 34:613–627, 1987.
- [3] A. Breitholtz, M. Olsen, A. Dahlbäck, y K. Hult. Plasma ochratoxin A levels in three Swedish populations surveyed using an ion-pair HPLC technique. *Food Addit. Contam.*, 8:183–192, 1991.
- [4] A. Breitholtz-Emanuelsson, F. Minervini, K. Hult, y A. Visconti. Ochratoxin a in human serum samples collected in southern Italy from healthy individuals suffering from different kidney malfunctions. *Natural Toxins*, 2:366–370, 1994.
- [5] A. Breitholtz-Emanuelsson, M. Olsen, A. Oskarsson, I. Palminger, y K. Hult. Ochratoxin A in cows milk and in human milk with corresponding human blood samples. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 76:842–846, 1993.
- [6] I. Bunge, G. Dirheimer, y R. Rösenthaller. In vivo and in vitro inhibition of protein synthesis in *Bacillus stearothermophilus* by ochratoxin A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 83:398–405, 1978.
- [7] M. Castegnaro. Prévalence de l'ochratoxine A dans le sang des populations exposées à la nourriture contaminée et études épidémiologiques. En *Atelier International sur l'Ochratoxine A*, pp 55–60. Edited by: Association Africaine de Microbiologie et d'Hygiène Alimentaire. Revue de Microbiologie et d'Hygiène Alimentaire, Sousse, Tunisie, 14–17 Novembre, 1995.
- [8] K.S. Chio y A.L. Tappel. Synthesis and Characterization of the Fluorescent Products derived from Malonaldehyde and Aminoacid. *Biochemistry*, 8(7):217–224, July, 1969.
- [9] Comisión Europea. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU Member States. *Food Sciences and Techniques. Report EUR 17523*, 1997.
- [10] Council for Agricultural Science and technology Cast. Mycotoxins: economic and health risks. Task force report 116, 91 pages, council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, 1989.
- [11] E.E. Creppy, M. Castegnaro, Y. Grosse, J. Mériaux, C. Manier, P. Moncharmont, y C. Waller. Etude de l'ochratoxicose humaine dans trois régions de France: Alsace, Aquitaine et région Rhône-Alpes. En *Human Ochratoxicosis and its Pathologies*, Vol. 231, pp 147–158. Edited by: E.E. Creppy and M. Castegnaro and G. Dirheimer. Colloque INSERM, 1993.
- [12] FAO. Worldwide regulations for mycotoxins 1997. A compendium. *Food and Nutrition Paper 64*, p 43, FAO, Rome, 1997.
- [13] E.V. Ferrufino. *Transfer of Ochratoxina A during lactation*. Occurrence and Exposure, Ph.D. Dissertation, Catholic University of Louvain, Belgium, 1998.

- [14] E.V. Ferrufino, S. Dubois, P. Leonard, C. Debauche, G. Alfaro, y Y. Larondelle. Ocratoxina A en muestras de leche materna de la región de Cochabamba-Bolivia. En *II Congreso Latinoamericano de micotoxicología*, Maracay, Venezuela, 14 -18 julio, 1997. (In Spanish).
- [15] E.V. Ferrufino, E.K. Tangni, Y. Larondelle, y S. Ponchaut. Transfer of ochratoxin a during lactation: Exposure of suckling via the milk of rabbit does fed a naturally-contaminated feed. *Food Addit. Contam.*, 17:167-175, 2000.
- [16] Y. Fukui, K. Hoshino, Y. Kameyama, T. Yasui, C. Toda, y H. Nagano. Placental transfer of ochratoxin A and its cytotoxic effect on the mouse embryonic brain. *Food Chem. Toxicol.*, 25:17-24, 1987.
- [17] R.M. Hadlock. Human ochratoxicosis in Germany updating 1993. En *Ochratoxicosis and its pathologies*, Vol. 231, pp 141-145. Edited by: E.E. Creppy and M. Castegnaro and G. Dirheimer, 1993. Eurotext(Montrouge, France: John Libbey).
- [18] B. Hald. Ochratoxin A in human blood in European countries. En *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*, pp 159-164. Edited by: M. Castegnaro and R. Plestina and G. Dirheimer and I.N. Chernozemsky and H. Bartsch, 1991. IARC Scientific Publication N° 115 (Lyon: IARC).
- [19] B. Hald, G.M. Wood, A. Boenke, B. Schurer, y P. Finglas. Ochratoxin in wheat: An intercomparison of procedures. *Food additives and contaminants*, 10:185-209, 1993.
- [20] International Agency for Research on Cancer - IARC. Ochratoxin A. En *IARC-Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*, Vol. IARC-56, pp 489-521. Lyon, 1993. WHO/IARC.
- [21] A. Khalef, C. Zidane, A. Charef, A. Gharbi, M. Tadjerouna, A.M. Betbeder, y E.E. Creppy. Ochratoxicose humaine en Algérie. En *Human Ochratoxicosis and its Pathologies*, Vol. 231, pp 123-128 (in French). Edited by: E.E. Creppy and M. Castegnaro and G. Dirheimer. Colloque INSERM, 1993. Eurotext (Montrouge, France: John Libbey).
- [22] I. Konrad y R. Röschenthaler. Inhibition of phenylalanine tRNA synthetase from *Bacillus subtilis* by ochratoxin A. *FEBS Lett.*, 83:341-347, 1977.
- [23] P. Krogh. Ochratoxins in food. En *Mycotoxins in Food*, pp 97-121. Edited by: P. Krogh. Food Sciences and Technology, Academic Press, New York, 1987.
- [24] T. Kuiper-Goodman, K. Omiski, R.R. Marquart, S. Malcolm, E. McMullen, G.A. Loambert, y T. Morton. Estimating human exposure to ochratoxin A in Canada. En *Human ochratoxicosis and its pathologies*, Vol. 231, pp 167-164. Edited by: E.E. Creppy and M. Castegnaro and G. Dirheimer. Colloque INSERM, 1993. Eurotex (Montrouge, France: John Libbey).

- [25] T. Kuiper-Goodman y P.M. Scott. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomed. Environ. Sciences*, 2:179-248, 1989.
- [26] R.R. Marquart y A.A. Frohlich. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J. Anim. Sci.*, 70:3968-3988, 1992.
- [27] S.M. Maxwell, F. Apeagei, H.R. Vries, D.D. Mwanmut, y R.G. Hendrickse. Aflatoxins in breast milk neonatal cord blood and sera of pregnant women. *J. Toxicol. Toxin.*, 8:19-29, 1989.
- [28] CH. Schlatter, J. Studer-Rohr, y Rásonyi. Carcinogenicity and kinetic aspects of ochratoxin A. *Food Addit. Contam.*, 13 supplement:43-44, 1996.
- [29] O.L. Shotwell, C.W. Hesseltine, y M.L. Goulden. Ochratoxin A: occurrence as natural contaminant of a corn sample. *Appl. Microbiol.*, 17:765-766, 1969.
- [30] B.J. Shreeve, D.S.P. Patterson, G.A. Pepin, B.A. Roberts, y A.E. Wrathall. Effect of feeding ochratoxin to pigs during early pregnancy. *Br. Vet. J.*, 133:412-417, 1977.
- [31] WHO. Ochratoxins. En *Selected Mycotoxins: Ochratoxin, Trichothecenes, Ergot.*, pp 27-69. IPCS Environmental Health Criteria Document 105. World Health Organisation., Genève, 1990. WHO/IPCS.
- [32] B. Zimmerli y R. Dick. Determinatin of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data. *J. chromatogr.*, 666:85-99, 1995.